

## DE10119274

Publication Title:

ENZYMATIC METHOD FOR THE ENANTIOSELECTIVE REDUCTION OF KETO COMPOUNDS

Abstract:

Abstract of DE 10119274

(A1) The invention relates to an enzymatic method for the enantioselective reduction of organic keto compounds to the corresponding chiral hydroxy compounds, an alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus minor* and a method for the enantioselective production of (S)-hydroxy compounds from a racemate.

-----  
Courtesy of <http://v3.espacenet.com>



DE 101 19 274 A 1

10 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**  
10 **DE 101 19 274 A 1**

61 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 12 N 9/04**  
C 12 N 15/53  
C 12 N 1/21  
C 12 N 15/74

21 Aktenzeichen: 101 19 274.6  
22 Anmeldetag: 20. 4. 2001  
43 Offenlegungstag: 31. 10. 2002

11 Anmelder:  
Juelich Enzyme Products GmbH, 65203 Wiesbaden,  
DE  
14 Vertreter:  
Zounek, N., Dipl.-Ing., Pat.-Ass., 65203 Wiesbaden

17 Erfinder:  
Gupta, Antje, Dr., 01259 Dresden, DE; Breese, Klaus,  
Dr., 79115 Freiburg, DE; Bange, Gert, 06108 Halle,  
DE; Neubauer, Peter, Prof., Oulu, FI

86 Entgegenhaltungen:  
DE 196 10 984 A1  
Kula M.-R. [u.a.]: Dehydrogenases in Synthesis of  
Chiral Compounds. In: Stereoselective Biocatalysis,  
2000, Patel R.N., Kap. 28, S. 847-850.;  
BLAST-Sequenzvergleich von Seq ID No. 4 und  
Poly-  
peptidsequenz der ADH aus de 19610984 A1;

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

64 Enzymatisches Verfahren zur enantioselektiven Reduktion von Ketoverbindungen

67 Die vorliegende Erfindung betrifft ein enzymatisches  
Verfahren zur enantioselektiven Reduktion von organi-  
schen Ketoverbindungen zu den entsprechenden chiralen  
Hydroxyverbindungen, eine Alkohol-Dehydrogenase aus  
Lactobacillus minor und ein Verfahren zur enantioselekti-  
ven Gewinnung von (S)-Hydroxyverbindung aus einem  
Razemat.

DE 101 19 274 A 1

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein enzymatisches Verfahren zur enantioselektiven Reduktion von organischen Ketonverbindungen zu den entsprechenden chiralen Hydroxyverbindungen, eine Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* und ein enzymatisches Verfahren zur enantioselektiven Gewinnung von (S)-Hydroxyverbindung aus einem Razemat.

[0002] Optisch aktive Hydroxyverbindungen sind wertvolle Synthesebausteine zur Herstellung einer Vielzahl pharmakologisch wichtiger Verbindungen. Diese Verbindungen sind oft schwer herstellbar durch klassische chemische Verfahren und können die für pharmakologische Anwendungen geforderte Enantiomerenreinheit nur selten erreichen. Daher werden zur Herstellung chiraler Verbindungen in der Regel biotechnologische Verfahren angewendet, wobei die stereoselektive Reaktion entweder von ganzen Mikroorganismen oder mit isolierten Enzymen durchgeführt wird.

[0003] Dabei hat sich oft der Einsatz von isolierten Enzymen als vorteilhaft erwiesen, da mit solchen in der Regel höhere Ausbeuten sowie eine höhere Enantiomerenreinheit erzielbar sind.

[0004] Dehydrogenasen und insbesondere Alkohol-Dehydrogenasen sind wertvolle Katalysatoren zur Gewinnung von chiralen Produkten durch stereoselektive Reduktion von organischen Ketonverbindungen zu den entsprechenden chiralen Alkoholen.

[0005] Bekannt sind im wesentlichen entsprechende Enzyme aus Hefe, Pferdeleber oder *Thermoanaerobium brockii*. Diese Enzyme benötigen als Coenzym NADH (Nicotinadenindinukleotid) oder NADPH (Nicotinadenindinukleotidphosphat). Weitere bekannte Alkohol-Dehydrogenasen sind beispielsweise eine (S)-spezifische Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis* oder eine (R)-spezifische Alkohol-Dehydrogenase aus der Gattung *Lactobacillus*. Beide Enzymtypen haben ein breites Substratspektrum an Ketonverbindungen und weisen eine hohe Enantioselektivität auf.

[0006] Die Alkohol-Dehydrogenasen aus *Lactobacillus kefir* (DE 40 14 573) und *Lactobacillus brevis* (DE 196 10 984) eignen sich insbesondere zur Gewinnung von chiralen (R)-Alkoholen.

[0007] Nachteilig für die Anwendung von Alkohol-Dehydrogenasen sind allerdings die geringe Enzymstabilität und Enzymaktivität der Alkohol-Dehydrogenasen in organischen Lösungsmitteln und die oft nur geringe Wasserlöslichkeit der zu reduzierenden Ketonverbindungen. Ferner ist ein weiterer limitierender Faktor für die Anwendung der Alkohol-Dehydrogenasen in organischen Lösungsmitteln der notwendige Einsatz von NADP oder NAD als Cofaktorbedarf, da der Cofaktor (NADP, NAD) wasserlöslich ist und in ökonomischen Verfahren regeneriert wird.

[0008] Die Erfindung bezweckt durch Modifikation der Verfahrensbedingungen die genannten Nachteile zu verbessern. Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Verwendung eines Zwei-Phasen-Systems, enthaltend ein organisches Lösungsmittel, Alkohol-Dehydrogenase, Wasser, Cofaktor und Ketonverbindung.

[0009] Das erfindungsgemäße Verfahren weist eine hohe Standzeit auf durch die enzymstabilisierende Wirkung des Lösungsmittels, eine enantiomeren Reinheit von mehr als 99,9% der hergestellten chiralen Hydroxyverbindungen und eine hohe Ausbeute bezogen auf die eingesetzte Menge der Ketonverbindung.

[0010] Das erfindungsgemäße Verfahren betrifft daher ein Verfahren zur enantioselektiven Reduktion einer Ketonverbindung der Formel I



wobei  $R^1$  und  $R^2$  unabhängig voneinander gleich oder verschieden sind und für

1. Wasserstoffatom,
2.  $-(C_1-C_{20})$ -Alkyl, worin Alkyl geradkettig oder verzweigt ist,
3.  $-(C_2-C_{20})$ -Alkenyl, worin Alkenyl geradkettig oder verzweigt ist und gegebenenfalls ein, zwei, drei oder vier Doppelbindungen enthält,
4.  $-(C_2-C_{20})$ -Alkynyl, worin Alkynyl geradkettig oder verzweigt ist und gegebenenfalls ein, zwei, drei oder vier Dreifachbindungen enthält,
5.  $-(C_6-C_{14})$ -Aryl,
6.  $-(C_1-C_8)$ -Alkyl- $-(C_5-C_{14})$ -Aryl, oder
7.  $R^1$  und  $R^2$  bilden zusammen mit dem  $-C(O)-$ Rest ein  $-(C_6-C_{14})$ -Aryl oder einen  $-(C_5-C_{14})$ -Heterocyclus, wobei die oben unter 1. bis 7. genannten Reste unsubstituiert sind oder ein- bis dreifach substituiert sind unabhängig voneinander durch

- a)  $-OH$ ,
- b) Halogen, wie Fluor, Chlor, Brom oder Jod,
- c)  $-NO_2$ ,
- d)  $-C(O)-O-(C_1-C_{20})$ -Alkyl, worin Alkyl gerade oder verzweigt ist und unsubstituiert oder ein- bis dreifach substituiert ist durch Halogen, Hydroxyl, Amino oder Nitro, oder
- e)  $-(C_5-C_{14})$ -Heterocyclus, der unsubstituiert oder ein- bis dreifach substituiert ist durch Halogen, Hydroxyl, Amino oder Nitro,

dadurch gekennzeichnet, dass man

- a) die Verbindung der Formel I, Alkohol-Dehydrogenase, Wasser, Cofaktor und ein organisches Lösungsmittel mit einem  $\log P$  von 0,5 bis 4,0,
- b) in einem Zwei-Phasen-System inkubiert und
- c) die gebildete chirale Hydroxyverbindung isoliert.

[0011] Kohlenstoffatomen im Ring.  $-(C_6-C_{14})$ -Arylreste sind beispielsweise Phenyl, Naphthyl.

[0012] Unter dem Begriff Aryl werden aromatische Kohlenstoffreste verstanden mit 6 bis 14 zum Beispiel 1-Naphthyl, 2-Naphthyl, Biphenyl, zum Beispiel 2-Biphenyl, 3-Biphenyl und 4-Biphenyl, Anthryl oder Fluoren. Biphenylreste, Naphthylreste und insbesondere Phenylreste sind bevorzugte Arylreste. Unter dem Begriff "Halogen" wird ein Element aus der Reihe Fluor, Chlor, Brom oder Jod verstanden. Unter dem Begriff " $-(C_1-C_{20})$ -Alkyl" wird ein Kohlenwasserstoffrest verstanden, dessen Kohlenstoffkette geradkettig oder verzweigt ist und 1 bis 20 Kohlenstoffatome enthält.

[0013] Der Begriff " $-(C_5-C_{14})$ -Heterocyclen" steht für einen monocyclischen oder bicyclischen 5-gliedrigen bis 14-gliedrigen heterocyclischen Ring, der teilweise gesättigt oder vollständig gesättigt ist. Beispiele für Heteroatome sind N, O und S. Beispiele für die Begriffe  $-(C_5-C_{14})$ -Heterocyclen sind Reste, die sich von Pyrrol, Furan, Thiophen, Imidazol, Pyrazol, Oxazol, Isoxazol, Thiazol, Isothiazol, Tetrazol, 1,2,3,5-Oxathiadiazol-2-Oxide, Triazolone, Oxadiazolone, Isoxazolone, Oxadiazolidione, Triazole, welche durch F, CN,  $-CF_3$  oder  $-C(O)-O-(C_1-C_4)$ -Alkyl substituiert sind, 3-Hydroxypyrron-2,4-dione, 5-Oxo-1,2,4-Thiadiazole, Pyridin, Pyrazin, Pyrimidin, Indol, Isoindol, Indazol, Phthalazin, Chinolin, Isochinolin, Chinoxalin, Chinazolin, Cinnolin,  $\alpha$ -Carbolin und benzanellierte, cyclopenta-, cyclohexa- oder cyclohepta-anellierte Derivate dieser Heterocyclen ableiten. Insbesondere bevorzugt sind die Reste 2- oder 3-Pyrrolyl, Phenylpyrrolyl wie 4- oder 5-Phenyl-2-pyrrolyl, 2-Furyl, 2-Thienyl, 4-Imidazolyl, Methylimidazolyl, zum Beispiel 1-Methyl-, 4- oder 5-imidazolyl, 1,3-Thiazol-2-yl, 2-Pyridyl, 3-Pyridyl, 4-Pyridyl, 2- oder 4-Pyridyl-N-oxid, 2-Pyrazinyl, 2-, 4- oder 5-Pyrimidinyl, 2-, 3- oder 5-Indolyl, substituiertes 2-Indolyl, zum Beispiel 1-Methyl-, 5-Methyl-, 5-Methoxy-, 5-Benzyloxy-, 5-Chlor- oder 4,5-Dimethyl-2-indolyl, 1-Benzyl-2- oder 3-indolyl, 4,5,6,7-Tetrahydro-2-indolyl, Cyclohepta[b]-5-pyrrolyl, 2-, 3- oder 4-Chinolinyl, 1-, 3- oder 4-Isochinolinyl, 1-Oxo-1,2-dihydro-3-isochinolinyl, 2-Chinolinyl, zum Beispiel 2- oder 3-(N-Methylpyrrolidinyl), Piperazinyl, Morpholinyl, Thiomorpholinyl, Tetrahydrothienyl oder Benzodioxolanyl.

[0014] Bevorzugte Verbindungen der Formel I sind 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester, Acetophenon, Acetessigsäuremethylester, Ethyl-2-oxo-4-phenylbutyrat, 2,5-Hexandion Ethylpyruvat oder 2-Octanon, bevorzugt 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester. Die Verbindungen der Formel I werden im erfindungsgemäßen Verfahren in einer Menge von 2% bis 30% bezogen auf das Gesamtvolumen eingesetzt, bevorzugt von 10% bis 25%, insbesondere von 15% bis 22%.

[0015] Dem Wasser wird bevorzugt ein Puffer zugesetzt, beispielsweise Kaliumphosphat-, Tris/HCl- oder Triethanolamin-Puffer mit einem pH-Wert von 5 bis 10, vorzugsweise ein pH-Wert von 6 bis 9. Die Pufferkonzentration beträgt von 10 mM bis 150 mM, bevorzugt von 90 mM bis 110 mM, insbesondere 100 mM. Zusätzlich enthält der Puffer auch Magnesiumionen, beispielsweise  $MgCl_2$  in einer Konzentration von 0,2 mM bis 10 mM, bevorzugt 0,5 bis 2 mM, insbesondere 1 mM.

[0016] Die Temperatur beträgt beispielsweise von etwa 10°C bis 70°C, bevorzugt von 30°C bis 60°C.

[0017] Die erfindungsgemäße einsetzbare organischen Lösungsmittel haben bevorzugt einen logP von 0,6 bis 2,0, insbesondere von 0,6 bis 1,9, insbesondere bevorzugt von 0,63 bis 1,75. Die bevorzugten organischen Lösungsmittel sind beispielsweise Diethylether, tertiär-Butylmethylether, Diisopropylether, Dibutylether oder Essigsäureethylester, insbesondere Essigsäureethylester. Essigsäureethylester kann beispielsweise in einer Menge von 1% bis 90% bezogen auf das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes eingesetzt werden, vorzugsweise von 15% bis 60%, insbesondere von 20% bis 50%.

[0018] Das Verhältnis von organischen Lösungsmittel zu Wasser beträgt von 9 zu 1 bis 1 zu 9, vorzugsweise von 1 zu 1 bis 1 zu 3.

[0019] Das Wasser bildet im erfindungsgemäßen Zwei-Phasen-System die eine flüssige Phase und das organische Lösungsmittel bildet die zweite flüssige Phase. Gegebenenfalls kann auch noch eine feste oder weitere flüssige Phase vorliegen, die beispielsweise durch nicht vollständig gelöste Alkohol-Dehydrogenase oder durch die Verbindung der Formel I entsteht. Bevorzugt sind jedoch zwei flüssigen Phasen ohne feste Phase. Die zwei flüssigen Phasen werden bevorzugt mechanisch gemischt, so dass große Oberflächen zwischen den beiden flüssigen Phasen erzeugt werden.

[0020] Die Konzentration des Cofaktors NADPH oder NADH bezogen auf die wässrige Phase beträgt von 0,05 mM bis 0,25 mM, insbesondere von 0,06 mM bis 0,2 mM.

[0021] Bevorzugt wird im erfindungsgemäßen Verfahren noch ein weiterer Stabilisator der Alkohol-Dehydrogenase eingesetzt. Geeignete Stabilisatoren sind beispielsweise Glycerin, Sorbitol oder Dimethylsulfoxid (DMSO).

[0022] Die Menge an Glycerin beträgt von 5% bis 30% bezogen auf das Volumen des gesamten Ansatzes. Bevorzugte Mengen an Glycerin sind von 10% bis 20%, insbesondere 20%.

[0023] Zu Regenerierung des verbrauchten NADH oder NADPH kann im erfindungsgemäßen Verfahren zusätzlich Isopropanol zugefügt werden. Beispielsweise wird das Isopropanol und NADP mit der Alkohol-Dehydrogenase zu NADPH und Aceton umgesetzt. Die eingesetzte Isopropanolmenge beträgt von 5% bis 30% bezogen auf das Volumen des gesamten Ansatzes. Bevorzugte Mengen an Isopropanol sind von 10% bis 20%, insbesondere 10%.

[0024] Geeignete Alkohol-Dehydrogenasen stammen beispielsweise aus Hefe, Pferdeleber oder Rhodococcus erythropolis, wobei diese Enzyme als Coenzym NADH benötigen, oder aus Thermoanaerobium brockii, Lactobacillus kefir oder Lactobacillus brevis, wobei diese Enzyme als Coenzym NADPH benötigen.

[0025] Wird eine Alkohol-Dehydrogenase beispielsweise aus Hefe, Pferdeleber, Thermoanaerobium brockii oder Rhodococcus erythropolis im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt, so wird aus der Verbindung der Formel I die entsprechende (S)-Hydroxyverbindung gewonnen. Wird eine Alkohol-Dehydrogenase beispielsweise aus Lactobacillus kefir oder Lactobacillus brevis im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt, so wird aus der Verbindung der Formel I die entsprechende (R)-Hydroxyverbindung gewonnen.

[0026] Die Alkohol-Dehydrogenase kann in dem erfindungsgemäßen Verfahren entweder vollständig gereinigt oder teilweise gereinigt eingesetzt werden oder in Zellen enthalten verwendet werden. Die eingesetzten Zellen können dabei nativ, permeabilisiert oder lysiert vorliegen.

[0027] Die Volumenaktivität der eingesetzten Alkohol-Dehydrogenase beträgt von 100 Units/ml (U/ml) bis

2000 U/ml, bevorzugt etwa 800 U/ml, bei einem Proteingehalt von etwa 20 mg/ml bis 22 mg/ml. Die bevorzugt eingesetzte Alkohol-Dehydrogenase hat eine spezifische Aktivität von etwa 35 bis 40 U/mg Protein. Je kg umzusetzende Verbindung der Formel I werden 20 000 bis 200 000 U Alkohol-Dehydrogenase eingesetzt, bevorzugt etwa 100 000 U. Der Enzymeinheit 1 U entspricht dabei der Enzymmenge die benötigt wird um 1 µmol der Verbindung der Formel I je Minute

(min) umzusetzen.

**[0028]** Das erfindungsgemäße Verfahren wird beispielsweise in einem geschlossenen Reaktionsgefäß aus Glas oder Metall durchgeführt. Dazu werden die Komponenten einzeln in das Reaktionsgefäß überführt und Rühren unter einer Atmosphäre von beispielsweise Stickstoff oder Luft geführt. Je nach Substrat und eingesetzter Verbindung der Formel I beträgt die Reaktionszeit von 1 Tag bis 14 Tage, bevorzugt 4 bis 7 Tage.

**[0029]** Anschließend wird das Reaktionsgemisch aufgearbeitet. Dazu wird die wäßrige Phase abgetrennt, die Essigsäurethylester-Phase wird gefiltert. Die wäßrige Phase kann gegebenenfalls noch einmal extrahiert werden und wie die Essigsäurethylester-Phase weiter aufgearbeitet werden. Danach wird die gefilterte Phase unter vermindertem Druck verdampft. Man erhält so beispielsweise das Produkt 4-Chlor-3-(8)-hydroxybutansäurethylester mit einer Enantiomerenreinheit von mehr als 99,9% und im wesentlichen frei vom Edukt 4-Chlor-3-oxo-butansäurethylester. Die Gesamtausbeute der Prozesse beträgt nach Destillation des Produktes von 82% bis 88% bezogen auf die eingesetzte Eduktmenge.

**[0030]** Überraschenderweise zeigen die organischen Lösungsmittel mit einem log-P-Wert von 0 bis 4 eine stabilisierende Wirkung auf die Alkohol-Dehydrogenase, während im Stand der Technik von der Verwendung der Zwei-Phasen-Systeme mit organischen Lösungsmittel abgeraten wird (M. R. Kula, U. Kragel; Kapitel 28, Dehydrogenasen in Synthesis of Chiral Compounds; R. N. Patel, Stereoselective Biocatalyses, 2000; Peters J. 9, Dehydrogenases-Characteristics, Design of Reaction Conditions, and Application, In: H. J. Rehm, G. Reed Biotechnology, Vol 3, Bioprocessing, VCH Weinheim, 1993; J. Lynda et al., Solvent selection strategies for extractive Biocatalysis, Biotechnol. Prog. 1991, 7, Seiten 116-124). Im erfindungsgemäßen Verfahren wird als organische Phase Essigsäurethylester verwendet, wobei die organische Phase zum einen als Reservoir für die Verbindung der Formel I dient, aber auch gleichzeitig das Reaktionsprodukt, die chirale Hydroxyverbindung aus der wäßrigen Phase extrahiert.

**[0031]** Im Gegensatz zum Stand der Technik führt der Einsatz von organischen Lösungsmitteln mit einem log-P-Wert von 0 bis 3 zu einer zusätzlichen im Zeitverlauf zunehmenden Stabilisierung der Alkohol-Dehydrogenase. Im Stand der Technik üben insbesondere organische Lösungsmittel mit einem log-P-Wert (Logarithmus des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten) von 0 bis 2 eine besonders instabilisierende Wirkung auf Enzyme aus und kommen somit als organische Phase im Zwei-Phasen-System kaum in Betracht (K. Faber, Biotransformations in organic chemistry, 3rd edition 1997, Springer Verlag, Kapitel 3. Bis 3.17).

**[0032]** Die Erfindung betrifft ferner die Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* mit hohem Temperaturoptimum. Die Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* hat die DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 3 und die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 4 gemäß des beiliegenden Sequenzprotokolls. Diese Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* ist R-spezifisch, wobei beispielsweise aus einer Verbindung der Formel I die entsprechende (R)-Hydroxyverbindung gewonnen werden kann. Die enantioselektive Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* lässt sich überraschenderweise in *Escherichia coli* RB 791 überexprimieren, während Alkohol-Dehydrogenasen aus anderen Arten der Gattung *Lactobacillus* nur in wesentlich geringerer Weise exprimiert werden konnten. Dies ist um so überraschender, da die Alkohol-Dehydrogenase im Wildstamm von *Lactobacillus minor* selbst nur sehr gering exprimiert wird und somit mit gängigen Screeningverfahren (Ganzzellbiotransformation, Aktivitätstest) nicht nachweisbar war. Es war daher sehr überraschend, dass sich aus *Lactobacillus minor* eine R-enantioselektive Alkohol-Dehydrogenase klonieren ließ und in *Escherichia coli* so außerordentlich stark überexprimierbar war (50% des Zellproteins des Klon, 20 000 Units/g Feuchtgewicht).

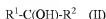
**[0033]** Das gereinigte Enzym aus *Lactobacillus minor* ist stabil in einem pH-Bereich von etwa 5,5 bis 8,5. Das Enzym ist bei etwa 40°C stabil und das pH-Optimum der enzymatischen Reaktion liegt im Bereich von pH 7 bis pH 7,5. Das Temperaturoptimum der enzymatischen Reaktion liegt bei etwa 55°C. Das Enzym weist ein breites Substratspektrum auf.

**[0034]** Das Enzym läßt sich mittels hydrophober Interaktionschromatographie bis zu einer spezifischen Aktivität von 35 bis 40 U/mg Protein reinigen.

**[0035]** Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Gewinnung der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor*. Dazu wird die DNA, die für die Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* kodiert, in einem geeigneten prokaryotischen oder eukaryotischen Mikroorganismus exprimiert. Bevorzugt wird die Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* in einen *Escherichia coli* Stamm transformiert und exprimiert, insbesondere in *Escherichia coli* RB 791.

**[0036]** Die Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* läßt sich beispielsweise so gewinnen, dass die rekombinanten *Escherichia coli* Zellen kultiviert werden, die Expression der Alkohol-Dehydrogenase induziert wird und anschließend nach etwa 10 bis 18 Stunden (h) die Zellen durch Ultraschallbehandlung oder durch French-Press (Gaulin, Siemens) aufgeschlossen werden. Der erhaltene Zelleextrakt kann entweder direkt verwendet werden oder weiter gereinigt werden. Dazu wird der Zelleextrakt beispielsweise zentrifugiert und der erhaltene Überstand wird einer hydrophoben Interaktionschromatographie unterworfen. Diese Chromatographie erfolgt bevorzugt bei pH 7,0 in einem wässrigen Puffer der auch Magnesiumionen enthält.

**[0037]** Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Gewinnung einer enantioselektiven (S)-Hydroxyverbindung der Formel II



wobei R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> unabhängig voneinander gleich oder verschieden sind und für

1. Wasserstoffatom,
2. -(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>)-Alkyl, worin Alkyl geradkettig oder verzweigt ist,

3.  $-(C_2-C_{20})$ -Alkenyl, worin Alkenyl geradkettig oder verzweigt ist und gegebenenfalls ein, zwei, drei oder vier Doppelbindungen enthält,
4.  $-(C_2-C_{20})$ -Alkyl, worin Alkyl geradkettig oder verzweigt ist und gegebenenfalls ein, zwei, drei oder vier Dreifachbindungen enthält,
5.  $-(C_6-C_{14})$ -Aryl,
6.  $-(C_1-C_8)$ -Alkyl- $-(C_6-C_{14})$ -Aryl, oder
7.  $R^1$  und  $R^2$  bilden zusammen mit dem  $-C(O)$ -Rest ein  $-(C_6-C_{14})$ -Aryl oder einen  $-(C_6-C_{14})$ -Heterocycl, wobei die oben unter 1. bis 7. genannten Reste unsubstituiert sind oder ein- bis dreifach substituiert sind unabhängig voneinander durch
  - a)  $-OH$ ,
  - b) Halogen, wie Fluor, Chlor, Brom oder Jod,
  - c)  $-NO_2$ ,
  - d)  $-C(O)-O-(C_1-C_{20})$ -Alkyl, worin Alkyl gerade oder verzweigt ist und unsubstituiert oder ein- bis dreifach substituiert ist durch Halogen, Hydroxyl, Amino oder Nitro, oder
  - e)  $-(C_5-C_{14})$ -Heterocycl, der unsubstituiert oder ein- bis dreifach substituiert ist durch Halogen, Hydroxyl, Amino oder Nitro,

dadurch gekennzeichnet, dass man

- a) ein racemisches Gemisch, enthaltend die Verbindung der Formel II, die erfindungsgemäße Alkohol-Dehydrogenase, Wasser, Cofaktor und ein organisches Lösungsmittel ein organisches Lösungsmittel mit einem  $\log P$  von 0,5 bis 4,0, beispielsweise aus der Reihe Diethylether, tertiär-Butylmethylether, Diisopropylether oder Essigsäureethylester,
- b) in einem Zwei-Phasen-System inkubiert und
- c) die gebildete enantiomerenreine (S)-Hydroxyverbindung isoliert.

[0038] Die Reaktionsbedingungen sind im wesentlichen dieselben wie im obengenannten Verfahren zur enantioselektiven Reduktion der Ketoverbindung der Formel I. Im Verfahren wird jedoch statt einer enantioselektiven Reduktion der Ketoverbindung der Formel I, die entsprechende (R)-Hydroxyverbindung der Formel II zur entsprechenden Ketoverbindung oxidiert. Ferner wird im Verfahren anstelle von Isopropanol Aceton zur Regenerierung von NADP eingesetzt. Beispielsweise wird das Aceton und NADPH mit der erfindungsgemäßen Alkohol-Dehydrogenase zu NADP und Isopropanol umgesetzt. Die eingesetzte Acetonmenge beträgt von 5% bis 30% bezogen auf das Volumen des gesamten Ansatzes. Bevorzugte Mengen an Aceton sind von 10% bis 20%, insbesondere 10%.

[0039] Die erfindungsgemäße Alkohol-Dehydrogenase kann für die Herstellung der Verbindung der Formel II entweder vollständig oder teilweise gereinigt vorliegen oder kann auch enthaltend in Zellen im Verfahren eingesetzt werden. Die Zellen können dabei nativ, permeabilisiert oder lysiert vorliegen.

[0040] Gegenstand der Erfindung ist auch ein rekombinanter Klon von *Escherichia coli* RB 791, der die Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* exprimiert und am 26. März 2001 unter den Bedingungen des Budapestervertrages bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig unter der Nummer DSM 14196 hinterlegt wurde.

[0041] Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele erläutert:

#### Beispiel 1

Screening nach R-Alkohol-Dehydrogenasen in Stämmen der Gattung *Lactobacillus* mittels Ganzzellbiotransformation

[0042] Zum Screening wurden verschiedene *Lactobacillen*stämme in folgendem Medium kultiviert (Angaben jeweils g/l): Glucose (20), Hefextrakt (5), Fleischextrakt (10), Di-Ammoniumhydrogencitrat (2), Natriumacetat (5), Magnesiumsulfat (0,2), Mangansulfat (0,05), Di-Kaliumhydrogenphosphat (2).

[0043] Das Medium wurde bei 121°C sterilisiert und die Stämme der Gattung *Lactobacillus* (im folgenden mit L. abgekürzt) wurden ohne weitere pH-Regulierung oder Sauerstoffzufuhr kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und für die Ganzzellbiotransformation wurden jeweils 4 g Zellen in einem Endvolumen von 10 ml Kaliumphosphatpuffer (KPi-Puffer) (50 mM, pH = 7,0) resuspendiert. Nach Zugabe von je 0,1 g Glucose wurden die Zellen für 15 min bei 30°C geschüttelt.

[0044] Zur Zellsuspension wurde 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester 4 in einer Endkonzentration von 40 mM zugegeben und nach jeweils 10 min und 120 min erfolgte die gaschromatographische Analyse des Medium. Dazu wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand filtriert und in Chloroform bis zu einer Endkonzentration von 10–15 µg/ml 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester verdünnt.

[0045] Der als Substrat eingesetzte 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester wurde von den verschiedenen *Lactobacillen*stämmen mit folgender Enantiomerenreinheit zum Ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutyrat umgesetzt.

[0046] Der Enantiomerenüberschuss berechnet sich wie folgt:  $ee(\%) = ((R\text{-Alkohol} - S\text{-Alkohol}) / (R\text{-Alkohol} + S\text{-Alkohol})) \times 100$ .

Tabelle 1

5	<b>Stamm Lactobacillus</b>	<b>ee 4-Chlor-3-(S)-hydroxy-butansäureethylester in %</b>
	<b>L. reuteri</b>	<b>34,6</b>
10	<b>L. kandleri</b>	<b>90,0</b>
	<b>L. collinoides</b>	<b>71,3</b>
15	<b>L. bif fermentans</b>	<b>53,6</b>
	<b>L. oris</b>	<b>63,4</b>
20	<b>L. brevis</b>	<b>74,0</b>
	<b>L. halotolerans</b>	<b>67,2</b>
25	<b>L. minor</b>	<b>18,6</b>
	<b>L. parabuchneri</b>	<b>78,5</b>
30	<b>L. kefir</b>	<b>87,8</b>
35	<b>L. fructosus</b>	<b>28,9</b>

## Beispiel 2

## Gewinnung rekombinanter R-spezifischer Alkohol-Dehydrogenasen

## A.) Präparation genomischer DNA aus Stämmen der Gattung Lactobacillus

45 [0047] Das Zellpellet aus etwa 2 ml Kulturflüssigkeit der Gattung Lactobacillus wurde in 300 µl TE-Puffer (enthaltend 10 mM Tris/HCl, pH = 8, 1 mM EDTA) resuspendiert, mit 20 mg/ml Lysozym versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Natriumdodecylsulfat (SDS) (10%), 100 µl Na-Perchlorat (5 M) und 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) zugegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde das Protein abzentrifugiert und die wäßrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Danach wurden 800 µl Ethanol (EtOH) (96%) zugegeben. Das Eppendorfgefäß wurde mehrfach invertiert und anschließend die ausgefallene chromosomale DNA in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 200 µl EtOH gewaschen. Die DNA wurde wiederum in ein neues Eppendorfgefäß überführt, unter verminderten Druck getrocknet und in 100 µl TE-Puffer gelöst.

## B.) Oligonukleotide als 5'- und 3'-Primer für die PCR (Polymerase chain reaction)

55 [0048] Die für die PCR verwendeten Primer wurden von der bekannten N-terminalen und C-terminalen Sequenz der Alkohol-Dehydrogenase aus L. kefir abgeleitet. Dabei wurden bekannte Präferenzen für bestimmte Codons in Lactobacillen berücksichtigt. So wurde vor jeden 5'-Primer das Codon ATG (Met) als Startcodon vorgesetzt, weiterhin wurde am 5'-Primer dem Startcodon die Schnittstelle für das Restriktionsenzym Bam III (GGATCC) vorangestellt um die spätere Klonierung in den Expressionektor zu ermöglichen. Hinter den 3'-Primer wurde das Stop codon (TAG) und die Schnittstelle für Hind III (AAGCTT) gesetzt. Die Primerkonstrukte sind im folgenden aufgelistet

N = A,T,Coder G; Y = T oder C; R = A oder G

65 5'Primer

5'GCGGATCCATGACNGAYCGNITRAARGGNAARGTNGC3' (SEQ ID NO: 1)

3'Primer

5'GGGAAGCTTCTATGTGNCNGTGTANCCNCCRTCNAC3' (SBQ ID NO: 2)

[0049] Die Primer wurden nach bekannten Verfahren hergestellt.

C.) PCR (Polymerase chain reaction) mit der genomischen DNA aus Stämmen der Gattung *Lactobacillus*

PCR-Ansatz (100 µl)

	Einsatz pro Reaktion	Konzentration
dNTP's	8µl	je NTP 2.5 nmol/µl
Oligos	je Oligo 10µl: 20µl	2pmol/µl
chromosomale DNA	3µl	ca. 1µg/µl
10 x Puffer (Promega)	10µl	
Taq- Polymerase (Promega)	1µl	2U/µl
H <sub>2</sub> O	58 µl	

dNTP's sind ein Gemisch von Desoxynucleotidtriphosphaten wie dATP, dGTP, dCTP, dTTP

Zyklus:

95°C 2 min. danach

80°C halten

heißer Start, danach

95°C 30 sec, danach

40°C 1 min 30x

danach jeweils 30 mal 95°C 30 sec, und 40°C 1 min. anschließend

72°C 2,5 min

danach

72°C 2,5 min

danach

10°C halten

[0050] Für die Analytik wurden 10 µl des Ansatzes auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei konstant 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die PCR zeigte die deutliche Amplifikation eines DNA-Stückes von etwa 750 bp.

D.) Isolierung der PCR-Fragmente aus dem Gel

[0051] Zur Gewinnung des PCR-Fragments wurde der gesamte PCR-Ansatz auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei konstant 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde das Gel in zwei Spuren geteilt, wovon eine den kompletten PCR-Ansatz und die andere nur eine Probe von 5 µl enthielt, so dass zum Ausschneiden des PCR-Fragments aus dem Gel zur Orientierung nur die Spur mit der Probe mit Ethidiumbromid anfärbt wurde um eine Schädigung des zu isolierenden PCR-Fragment durch Ethidiumbromid und durch UV-Licht auszuschließen.

[0052] Die Isolierung aus dem Gel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von der Firma Qiagen aus Hilden.

[0053] Die Konzentrationsbestimmung ergab eine Gesamtkonzentration von 20 ng/µl DNA.

E.) Ligation

[0054] Zur Vorbereitung der Ligation wurden das gereinigte PCR-Fragment und der verwendete Klonierungsvektor pQE30 oder pQE 70 beide von der Firma Qiagen mit Bam HI und Hind III geschnitten (4 µl DNA = 200 ng DNA, 1 µl 10x Puffer, 1 µl Enzym, BSA und H<sub>2</sub>O (Biolabs, New England)).

[0055] Das geschnittene Plasmid wurde dann erneut mittels QIAquick Gel Extraction Kit gereinigt, in Wasser aufgenommen mittels alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (USB, Amersham Life Science).

[0056] Zur Reinigung wurden die entsprechenden Reaktionsansätze erneut auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und so das verdäute Amplifikat sowie das Plasmid wie unter D.) beschrieben aus dem Gel isoliert. Die Konzentration von Plasmid und Amplifikat nach der Reinigung betrug etwa 20 ng/µl.

[0057] Zur Ligation wurden 3 µl pQE30 oder pQE 70 (60 ng), 2,5 µl Amplifikat (50 ng), 2 µl Ligasepuffer (Boehringer; Mannheim), 1,5 µl H<sub>2</sub>O und 1 pl T4-Ligase (Boehringer; Mannheim) eingesetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert.



[0058] Anschließend wurden 40 µl elektrokompente Zellen von *Escherichia coli* RB791 mit 1,5 µl Ligationsansatz durch Elektroporation transformiert. Die Zellen wurden in 500 µl SOC-Medium gegeben, 45 min bei 37°C inkubiert und anschließend je 250 µl auf LB<sub>amp</sub>-Agarplatten ausplattiert. Das SOC-Medium enthält pro Liter Wasser 20 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml von 1 M MgSO<sub>4</sub> und 10 ml von 1 M MgCl<sub>2</sub>. LB<sub>amp</sub>-Agarplatten enthalten pro Liter Wasser 10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl, 20 g Agar, pH 7,0 und 50 mg Ampicillin.

[0059] Gewachsene Kolonien wurden abgeimpft und in 4 ml Flüssigkultur (LB<sub>amp</sub>-Medium) über Nacht bei 37°C kultiviert. Von dieser Zellsuspension wurden je 2 ml zur Plasmidpräparation (entsprechend dem Qiagen miniprep Protokoll (Quiagen, Hilden)) eingesetzt. Von der Plasmidpräparation wurden ein Restriktionsverdau mit Bam HI und Hind III angesetzt. Der komplette Verdau wurde auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt (Nachweis des 750 kp Inserts) und die Plasmide daraufhin gegebenenfalls zur Sequenzierung eingesetzt.

[0060] Klone mit 750 kp Insert wurden dann auf LB<sub>amp</sub>-Agarplatten ausplattiert.

#### F.) Sequenzierung der Plasmide

[0061] Die Sequenzierung wurde mittels dem SequiThermEXCEL II Long-Read DNA Sequencing Kit (Biozym, Oldendorf) am Li-Cor-Sequencer (MWG Biotech, Ebersberg) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Primer wurden die Standard Sequenzierungsprimer für pQE-Vektoren benutzt.

#### G.) Screening der Klone hinsichtlich löslicher Expression der R-ADH

[0062] Klone mit Inserts von 750 kp wurden hinsichtlich enzymatischer Aktivität und Stereoselektivität untersucht. Dazu wurden die Kolonien von den LB<sub>amp</sub>-Agarplatten abgeimpft und in 20 ml Flüssigkulturen (LB<sub>amp</sub>-Medium) bei 25°C kultiviert. Bei einer Zelldichte (OD<sub>500</sub>) von 0,5 erfolgte dann die Induktion mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG). Nach 18 h wurden die Zellen abzentrifugiert und je 40 mg Zellen in 350 µl Kpi-Puffer (50 mM, pH = 7, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) aufgenommen. Die Enzymfreisetzung aus den Zellen wurde durch Naßvermahlung mit Hilfe von Glasperlen (0,5 g, 0,3 mm) erreicht. Dazu erfolgte ein 20 minütlicher Aufschluß mittels Reisch-Mühle bei 4°C.

[0063] Der Enzymtest enthielt 870 µl Triethanolaminpuffer (100 mM, pH = 7,0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>), 100 µl einer 100mmolaren Lösung 4-Cl-Acetessigsäurethylester, 10 µl NADPH (Endkonzentration 0,19 mM) und 20 µl Enzymlösung.

[0064] Die Definition der Enzymeinheit: 1 U entspricht der Enzymmenge die benötigt wird um 1 µmol Substrat (4-Chlor-3-oxo-butansäurethylester) pro 1 min umzusetzen.

[0065] Zum Nachweis der Stereoselektivität wurden 480 µl Triethanolaminpuffer (100 mM, pH = 7,0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) mit 1,0 mM 4-Chlor-3-oxo-butansäurethylester, 1,9 mM NADPH (jeweils Endkonzentration) und 20 µl Enzymlösung inkubiert. Nach 15 min Inkubation wurde der Reaktionsansatz filtriert und 1 : 10 in Chloroform verdünnt und eine Probe wurde mittels GC-MS analysiert.

[0066] Bedingungen der Gaschromatographie (GC):

chirale Säule: Lipodex E, ID = 0,25 mm, I = 25 m (Macherey-Nagel)

1. 2 min 60°C

2. in 28 min von 60°C auf 130°C mit einer Rate von 2,5°C pro Minute

3. 15 min bei 130°C

[0067] Aus den folgenden Lactobacillenstämmen konnte eine (R)-spezifische Alkohol-Dehydrogenase kloniert und aktiv überexprimiert werden:

Stamm	Plasmid	Klon Nummer	Aktivität in U/g Zellen*	ee in %
L. parabuchneri	pQE 30	12	450	>99,9
L. parabuchneri	pQE 30	14	170	>99,9
L. kandleri	pQE 30	11	280	>99,9
L. kandleri	pQE 70	17	710	>99,9
L. minor	pQE 30	2	2.830	>99,9
L. minor	pQE 70	3	680	>99,9
L. minor	pQE 70	4	700	>99,9

\* Aktivität berechnet aus G.) (Naßvermahlung); Die Aktivitäten liegen nach Fermentation und Aufschluß mit French-Press erheblich höher.

**[0068]** Der Stamm mit der höchsten enzymatischen Aktivität wurde zur Enzymgewinnung im Fermenter (Fed batch, 10 l) kultiviert. Die Induktion erfolgte bei einer OD<sub>500</sub> von 40 mit 1 mM IPTG. Nach 18 h erfolgte die Zellernte wobei 300 g Zellen in 3 l Kpi-Puffer (50 mM, pH = 7, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) aufgenommen wurden, anschließend erfolgte der Zellaufschluß mittels French-Press (Gaulin, Siemens). Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird im folgenden als Rohextrakt bezeichnet und wies eine Volumenaktivität von etwa 2000 U/ml (20 000 U/g Feuchtmasse) auf.

**[0069]** Für die Enzymcharakterisierung wurde ein Teil des erhaltenen Enzyms mittels hydrophober Interaktionschromatographie auf Q-Sepharose ff (fast flow) gereinigt. Die verwendete Säule wurde dazu mit 50 mM Kpi-Puffer pH = 7,0, 1 mM MgCl<sub>2</sub> äquilibriert. Nach Auflagen des Rohextrakts auf die Säule und kurzem Spülen mit dem Äquilibrierungspuffer wurde das Enzym mit einem steigenden linearem Salzgradienten (0 - 1 M NaCl, 1 ml/min) bei einer Salzkonzentration von etwa 0,3 M NaCl eluiert. Nach Vereinigen der enzymhaltigen Fraktionen erhielt man etwa 25 ml des gereinigten Enzyms mit einer Volumenaktivität von etwa 800 U/ml und einem Proteingehalt von 20 bis 22 mg/ml. Das so gereinigte Enzym hat also eine spezifische Aktivität von etwa 35 bis 40 U/mg Protein.

**[0070]** Alle enzymatischen Aktivitäten wurden bei 25°C bestimmt. Die Enzymaktivität wurde wie folgt berechnet:

Berechnung: 1 Unit = 1 µmol Substratumsatz/min  
Lambert-Beersches Gesetz

**[0071]** Abnahme des NADPH wurde bei 340 nm verfolgt (siehe enzymatischer Testansatz) =  $\Delta E/\text{min}$

N = Verdünnungsfaktor Enzym

V = Volumen Enzym im ml (0,01)

V<sub>Küvette</sub> = Küvettenvolumen = 1 ml

d = Schichtdicke der Küvette = 1 cm

$\epsilon_{\text{NADPH}}$  = Extinktionskoeffizient NADPH =  $6,22[\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$

Aktivität =  $(\Delta E/\text{min} \cdot N \cdot V_{\text{Küvette}}) / (\epsilon_{\text{NADPH}} \cdot V \cdot d)$

**[0072]** Proteinbestimmung wurde nach Bradford angewandt (Bio-Rad- Laboratories GmbH, Protein Assay)

#### Beispiel 3

#### Enzymkatalysierte Herstellung von Ethyl (S)-4 chloro-3-hydroxybutyrat

##### A.) im 5 Liter Maßstab

**[0073]** Für die enzymkatalysierte Synthese von Ethyl (S)-4 chloro-3-hydroxybutyrat aus 4-Chlor-3-oxo- butansäureethylester wurde der in Beispiel 2 gewonnene Rohextrakt der Alkohol-Dehydrogenase und das Coenzym NADP eingesetzt. Das oxidierte Coenzym wurde durch gleichzeitige Anwesenheit von Isopropanol kontinuierlich regeneriert, so dass die Reaktion nur katalytische Mengen an Coenzym erfordert.

**[0074]** Der Ansatz enthielt:

2 l Triethanolamin- Puffer 100 mM pH = 7,0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerin,

400 mg NADP,

600 ml Isopropanol,

800 ml Essigsäureethylester,

600 ml 4-Chlor-3-oxo- butansäureethylester und

etwa 100 000 Units Alkohol-Dehydrogenase.

**[0075]** Nach 3 Tagen Rühren bei Raumtemperatur konnte gaschromatographisch der vollständige Umsatz des 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester zum Ethyl (S)-4 chloro-3-hydroxybutyrat mit über 99,9% Enantiomerenreinheit nachgewiesen werden.

**[0076]** Nach Abtrennung der wässrigen Phase, Abdampfen des Lösungsmittels und gegebenenfalls Destillation erhält man das saubere Ethyl (S)-4 chloro-3-hydroxybutyrat mit über 99,9%iger Enantiomerenreinheit.

##### B.) im 50 l Maßstab

**[0077]** Der Reaktionsansatz zum Umsatz von 10 l 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester ist wie folgt zusammengesetzt::  
18 l Triethanolamin-Puffer 100 mM pH = 7,0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerin,  
4 g NADP,

10 l Isopropanol,

10 l Essigsäureethylester,

10 l 4-Chlor-3-oxo- butansäureethylester und

etwa 2 Millionen Units Alkohol-Dehydrogenase (1,25 l Rohextrakt).

**[0078]** Nach 7 Tagen Rühren bei Raumtemperatur konnte gaschromatographisch der vollständige Umsatz des 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylesters zum Ethyl (S)-4 chloro-3-hydroxybutyrat mit über 99,9% Enantiomerenreinheit nachgewiesen werden.

5

## A.) pH-Stabilität

[0079] Die Abhängigkeit der Aktivität des Enzyms bei Lagerung in Puffern mit verschiedenen pH-Werten wurde im Bereich von pH 4 bis 11 untersucht. Dazu wurden verschiedene Puffer (50 mM) im Bereich von pH 4 bis 11 angesetzt und das in Beispiel 2 gereinigte Enzym darin 1 : 100 verdünnt und 30 min inkubiert. Alle Puffer enthielten 1 mM  $MgCl_2$ . Anschließend wurden davon 10  $\mu$ l im normalen Enzymtest eingesetzt (Triethanolaminpuffer 100 mM pH = 7,0, 1 mM  $MgCl_2$ , 10 mM 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester und 0,19 mM NADPH). Die Reaktion wurde für 1 min bei 30°C und 340 nm verfolgt.

[0080] Ausgangswert ist dabei der Messwert, den man unmittelbar nach Verdünnung des Enzyms in Triethanolaminpuffer 50 mM pH = 7,0 erhält. Dieser Wert entsprach unter vorgegeben Bedingungen einer Extinktionsänderung von 0,20/min und wurde als 100%-Wert gesetzt und alle folgenden Messwerte wurden zu diesem Wert ins Verhältnis gesetzt.

15

Tabelle 2

PH-Wert	Puffersystem	Aktivität in % (n=2)	Puffersystem	Aktivität in % (n=2)
4	Na-acetat/Essigsäure	87,5 $\pm$ 6,5		
4,5	Na-acetat/Essigsäure	94,5 $\pm$ 3,0		
5	Na-acetat/Essigsäure	94,5 $\pm$ 1,5	MES/NaOH	55 $\pm$ 5
5,5	$KH_2PO_4/K_2PO_4$	96 $\pm$ 3	MES/NaOH	77,1 $\pm$ 2,1
6	$KH_2PO_4/K_2PO_4$	100 $\pm$ 0	Triethanolamin/NaOH	100 $\pm$ 0
6,5	$KH_2PO_4/K_2PO_4$	97,5 $\pm$ 2,5	Triethanolamin/NaOH	100 $\pm$ 0
7	$KH_2PO_4/K_2PO_4$	100 $\pm$ 0	Triethanolamin/NaOH	97,9 $\pm$ 2,1
7,5	$KH_2PO_4/K_2PO_4$	97,5 $\pm$ 7,5	Tris/HCl	94,6 $\pm$ 1,3
8	$KH_2PO_4/K_2PO_4$	93,0 $\pm$ 3,0	Tris/HCl	89,2 $\pm$ 0
8,5	$KH_2PO_4/K_2PO_4$	102,5 $\pm$ 2,5	Tris/HCl	60 $\pm$ 4,2
9	Glycin/NaOH	76,5 $\pm$ 1,5	Tris/HCl	63,1 $\pm$ 4,8
9,5	Glycin/NaOH	52,5 $\pm$ 7,5		
10	Glycin/NaOH	52,5 $\pm$ 7,5		
11	Glycin/NaOH	0,0 $\pm$ 0		

[0081] Tabelle 2 zeigt, dass das Enzym eine gute pH-Stabilität insbesondere im sauren Bereich aufweist, dabei scheint die Enzymstabilität nicht nur vom pH-Wert, sondern auch vom verwendeten Puffersystem abhängig zu sein. Beispielsweise stellt man bei der Verwendung von TRIS und MES-Puffer bei gleichem pH-Wert eine stärkere Inaktivierung des Enzyms fest als im KPi-Puffer.

65

[0082] Im KPi-Puffer zeigte sich im pH-Bereich von 5,5 bis 8,5 keine signifikante Inaktivierung.

## B.) Temperaturstabilität

[0083] In analoger Weise wie unter A.) beschrieben wurde die Temperaturstabilität für den Bereich von 25°C bis 50°C bestimmt. Dazu wurde jeweils eine 1 : 100 Verdünnung des gereinigten Enzyms für 30 min bei der jeweiligen Temperatur inkubiert und anschließend bei 30°C mit dem obigen Testansatz gemessen. Auch hier wurde als Ausgangswert der Meßwert herangezogen, den man unmittelbar nach Verdünnung des Enzyms in Triethanolaminpuffer 50 mM pH = 7,0 erhält. Dieser Wert wurde auch hier als 100%-Wert gesetzt. Die Alkohol-Dehydrogenase aus L. minor ist bis zu einer Temperatur von 40°C stabil. Danach sinkt die Aktivität rapide ab.

Tabelle 3

Temperatur	Aktivität in % (n=4)	Temperatur	Aktivität in % (n=4)
25	101 ± 3,2	40	33,4 ± 3,8
30	81,2 ± 5,8	42	0 ± 0
35	67,0 ± 1,6	45	0 ± 0
37	20,2 ± 2,4	50	0 ± 0

## C.) pH-Optimum

[0084] Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde die enzymatische Reaktion in dem jeweiligen in Tabelle 3 aufgeführten Puffer bestimmt. Die Konzentration des 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester betrug wie im Standardtest 10 mM und von NADPH 0,19 mM. Die Reaktion wurde bei 30°C bestimmt. Dabei konnte für das erfindungsgemäße Enzym ein pH-Optimum zwischen 7 und 7,5 ermittelt werden.

Tabelle 4

pH-Wert	Puffersystem	Aktivität in U/ml unverdünntes Enzym
4	Na-acetat/Essigsäure	85
4,5	Na-acetat/Essigsäure	132
5	MES/NaOH	218
5,5	MES/NaOH	240
6	Triethanolamin/NaOH	381

6,5	Triethanolamin/NaOH	349
7	Triethanolamin/NaOH	510
7,5	Tris/HCl	707
8	Tris/HCl	585
8,5	Tris/HCl	486
9	Tris/HCl	488
10	Glycin/NaOH	131
11	Glycin/NaOH	0

## D.) Temperatur-Optimum

[0085] Zur Bestimmung der optimalen Testtemperatur wurde die Enzymaktivität von 25°C bis 60°C gemessen. Der Testansatz entsprach der Standardkonzentration von 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester und NADPH. Wie aus Tabelle 5 ersichtlich hat das Enzym seine optimale Testtemperatur bei 55°C, anschließend sinkt die Aktivität rapide ab.

Tabelle 5

Temperatur	Aktivität in U/ml unverdünntes Enzym	Temperatur	Aktivität in U/ml unverdünntes Enzym
25	540	45	2469
30	1235	50	2469
35	1968	55	2855
40	1621	60	0

## E.) Substratspektrum

[0086] Ferner wurden anstelle von 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester noch weitere Substrate in dem enzymatischen Testansatz eingesetzt. Dafür wurde folgender Testansatz verwendet:

970 µl Triethanolaminpuffer (100 mM, pH = 7,0, 1 mM MgCl<sub>2</sub> mit 10 mM Ketoverbindung)

20 µl NADPH (0,19 mM im Testansatz)

10 µl Enzym (1 : 100)

[0087] Dabei wurde die mit 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester ermittelte Aktivität 100% gesetzt und die Enzymaktivitäten der anderen Substrate zu diesem Wert ins Verhältnis gesetzt.

Tabelle 6

Substrat	Aktivität in % (n=2)
4-Chlor-3-oxo- butansäureethylester	100
Ethylpyruvat	192,3 ± 11,5
2-Octanon	90,8 ± 1,2
Acetoacetatmethylester	120 ± 7,7
2-Oxo-4-phenylbutyratethylester	62,7 ± 4,8

## F.) Enzymstabilität in organischen Lösungsmitteln

[0088] Zur Untersuchung der Enzymstabilität bei Kontakt mit organischen Lösungsmitteln wurde die Alkohol-Dehydrogenase aus *L. minor* in den angegebenen Lösungsmittelgemischen 1 : 100 verdünnt und bei Raumtemperatur inkubiert (bei nicht-wassermischbaren organischen Lösungsmitteln bezieht sich die Verdünnung auf die wässrige Phase). Dabei wurde eine ständige Durchmischung beider Phasen gewährleistet (Shaker, 200 rpm). Anschließend wurden 10 µl der Enzymlösung im Standardtestansatz eingesetzt. Auch hier wurde der Ausgangswert nach Verdünnung im Puffer (Triethanolaminpuffer 100 mM, pH = 7,0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) gleich 100% gesetzt und alle weiteren Werte zu diesem ins Verhältnis gesetzt.

Tabelle 7

## A.) wassermischbare Lösungsmittel

Lösungsmittel	logP	t= 2h	T= 8h	t= 24h	t= 48h
<b>Puffer</b>		<b>86</b>	<b>70</b>	<b>3</b>	<b>0</b>
<b>10 % Isopropanol</b>	0,28	32	34	16	0
<b>20 % Isopropanol</b>	0,28	16	17	7	0
<b>10% DMSO</b>	-1,3	73	54	60	40
<b>20% DMSO</b>	-1,3	73	54	57	40
<b>1M Sorbitol</b>		93	74	60	6
<b>10 % Glycerin</b>	-3,0	120	64	62	28
<b>20% Glycerin</b>	-3,0	120	100	100	104

[0089] Wie aus Tabelle 7A ersichtlich wirken Glycerin, DMSO und Sorbitol aktivierend bzw. stabilisierend auf die eingesetzte Alkoholdehydrogenase. Das im Prozess einzusetzende Isopropanol hingegen wirkt inaktivierend.

B.) nicht wassermischbare Lösungsmittel

Lösungsmittel	LogP	t= 2h	t= 8h	t= 24h	t= 48h
<b>Puffer</b>		<b>86</b>	<b>70</b>	<b>3</b>	<b>0</b>
<b>20% Essigsäureethylester</b>	<b>0,68</b>	<b>87</b>	<b>50</b>	<b>10</b>	<b>8</b>
<b>20 % Diethylether</b>	<b>0,85</b>	<b>53</b>	<b>42</b>	<b>37</b>	<b>23</b>
<b>20 %Tert-Buthylmethylether</b>	<b>1,21</b>	<b>67</b>	<b>51</b>	<b>38</b>	<b>24</b>
<b>20 Diisopropylether</b>	<b>1,55</b>	<b>100</b>	<b>57</b>	<b>41</b>	<b>29</b>
<b>20 % Dibutylether</b>	<b>2,9</b>	<b>92</b>	<b>71</b>	<b>23</b>	<b>6</b>
<b>20 % Pentan</b>	<b>3,0</b>	<b>74</b>	<b>55</b>	<b>7</b>	<b>6</b>
<b>20 % Hexan</b>	<b>3,5</b>	<b>80</b>	<b>39</b>	<b>2</b>	<b>5</b>
<b>20 % Heptan</b>	<b>4</b>	<b>51</b>	<b>49</b>	<b>7</b>	<b>6</b>
<b>20 % Octan</b>	<b>4,5</b>	<b>87</b>	<b>47</b>	<b>2</b>	<b>1</b>

[0090] Wie aus Tabelle 7B ersichtlich zeigt die untersuchte Alkoholdehydrogenase in einer breiten Zahl organischer Lösungsmittel eine beachtliche Stabilität. Auffallend ist dabei, dass Lösungsmittel mit logP-Werten zwischen 0 und 3 die untersuchte Alkoholdehydrogenase nicht stärker inhibieren als solche mit logP-Werten zwischen 3 und 4, 5, insbesondere im Hinblick auf längere Inkubationszeiten (24 h und 48 h) haben Lösungsmittel mit logP-Werten zwischen 0 und 3 stabilisierende Wirkung auf die untersuchte ADH, verglichen mit den entsprechenden Werten im Puffer. Die untersuchten aliphatischen Lösungsmittel Pentan, Hexan, Heptan und Octan zeigen diese stabilisierende Wirkung bei Langzeitinkubation nicht.

[0091] Der logP-Wert einer Komponente X ist der Logarithmus des Verteilungskoeffizient von X im Octanol/Wasser Zweiphasensystem (50/50)

P = Konzentration von X in Octanolphase/Konzentration von X in wägriger Phase

#### G. Enzymstabilität unter Prozessbedingungen

[0092] Zur Untersuchung der Enzymstabilität unter Prozessbedingungen wurde die Alkohol-Dehydrogenase aus *L. minor* mit dem im Zwei-Phasen-System verwendeten Lösungsmittelgemischen 1 : 100 verdünnt und bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 µl der Enzymlösung im Standardtestansatz eingesetzt.

[0093] In Tabelle 8 sind die Enzymaktivitäten in % vom Ausgangswert dargestellt.

Tabelle 8

	6 h	20 h	46 h	60 h	84 h
<b>Triethanolamin-Puffer, 100 mM, 1 mM MgCl<sub>2</sub></b>	<b>100</b>	<b>75</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Mischung B</b>	<b>100</b>	<b>85</b>	<b>80</b>	<b>60</b>	<b>55</b>
<b>Mischung C</b>	<b>110</b>	<b>95</b>	<b>95</b>	<b>85</b>	<b>80</b>
<b>Mischung D</b>	<b>100</b>	<b>65</b>	<b>55</b>	<b>50</b>	<b>50</b>

**Mischung B: Puffer, 10% Glycerin, 10% Isopropanol**

**Mischung C: Puffer, 20% Glycerin, 10% Isopropanol**

**Mischung D: Puffer, 10% Glycerin, 10% Isopropanol + 20% Essigsäureethylester**

[0094] Es wurde festgestellt, dass die rekombinante Alkohol-Dehydrogenase aus *L. minor* in der im Zwei-Phasen-System verwendeten Kombination von Lösungsmitteln mehrere Tage stabil und aktiv ist.

# DE 101 19 274 A 1

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Juelich Enzyme Products GmbH

<120> Enzymatisches Verfahren zur enantioselektiven Reduktion  
von Ketoverbindungen

<130> (TH) Juelich Enzyme

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 795

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA Primer

<400> 1

atgagaggat cgcatacaca tcaccatcac ggatccatga cgcatacggtt gaaggggaaa 60  
gtagcaattg taactggcgg taccttgga attggcttgg caatcgctga taagtttgtt 120  
gaagaaggcg caaaggttgt tattaccggc cgtcacgctg atgtagggtga aaaagctgcc 180  
agatcaatcg gcggcacaga cgttatccgt tttgtccaac acgatgcttc tgatgaaacc 240  
ggctggacta agttgtttga tacgactgaa gaagcatttg gccaggttac caggttggc 300  
aacaatgccg gaattgcggt cagcaagagt gttgaagata ccacaactga agaattggcg 360  
aagctgctct cagttaactt ggatggtgtc ttcttcggtt cccgtcttgg aatccaacgt 420  
atgaagaata aaggactcgg agcatcaatc atcaatatgt catctatcga aggttttgtt 480  
ggatgatccg ctctgggtgc atacaacgct tcaaaagggt ctgtcagaat tatgtctaaa 540  
tcagctgcct tggattgcgc tttgaaggac tacgatgttc gggttaaac tggtcatcca 600  
ggttatatca agacaccatt ggttgacgat cttgaagggg cagaagaaat gatgtcacag 660  
cggaccaaga caccaatggg tcatatcggt gaacctaacg atatcgcttg gatctgtgtt 720  
tacctggcat ctgacgaatc taaatttggc actgggtgcag aattcgttgt cgacggaggg 780  
tacaccgccc aatag 795

<210> 2

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA Primer



# DE 101 19 274 A 1

<400> 2  
gcggatccat gacngaycgn ttraarggna argtngc

37

5

<210> 3  
<211> 36

10

<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

15

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA Primer

<400> 3  
gggaagcttc taytngcngc trtancncc rtcnac

20

36

<210> 4  
<211> 264

25

<212> PRT  
<213> Lactobacillus sp.

30

<400> 4  
Met Arg Gly Ser His His His His His Gly Ser Met Thr Asp Arg  
1 5 10 15

35

Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr Leu Gly Ile Gly  
20 25 30

40

Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala Lys Val Val Ile  
35 40 45

45

Thr Gly Arg His Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala Arg Ser Ile Gly  
50 55 60

50

Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala Ser Asp Glu Thr  
65 70 75 80

Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala Phe Gly Pro Val  
85 90 95

55

Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Val Ser Lys Ser Val Glu  
100 105 110

60

Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser Val Asn Leu Asp  
115 120 125

Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg Met Lys Asn Lys

65

130	135	140		
Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile Glu Gly Glu Val				
145	150	155	160	5
Gly Asp Pro Ala Leu Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys Gly Ala Val Arg				
	165	170	175	10
Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu Lys Asp Tyr Asp				
	180	185	190	15
Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Tyr Ile Lys Thr Pro Leu Val				
	195	200	205	
Asp Asp Leu Glu Gly Ala Glu Glu Met Met Ser Gln Arg Thr Lys Thr				20
	210	215	220	
Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala Trp Ile Cys Val				25
	225	230	235	240
Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly Ala Glu Phe Val				
	245	250	255	30
Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln				
	260			35

## Patentsprüche

1. Verfahren zur enantioselektiven Reduktion einer Ketoverbindung der Formel I  
 $R^1-C(O)-R^2$  (I)  
wobei  $R^1$  und  $R^2$  unabhängig voneinander gleich oder verschieden sind und für
  1. Wasserstoffatom,
  2.  $-(C_1-C_{20})$ -Alkyl, worin Alkyl geradkettig oder verzweigt ist,
  3.  $-(C_2-C_{20})$ -Alkenyl, worin Alkenyl geradkettig oder verzweigt ist und gegebenenfalls ein, zwei, drei oder vier Doppelbindungen enthält,
  4.  $-(C_2-C_{20})$ -Alkynyl, worin Alkynyl geradkettig oder verzweigt ist und gegebenenfalls ein, zwei, drei oder vier Dreifachbindungen enthält,
  5.  $-(C_6-C_{14})$ -Aryl,
  6.  $-(C_1-C_3)$ -Alkyl- $-(C_6-C_{14})$ -Aryl, oder
  7.  $R^1$  und  $R^2$  bilden zusammen mit dem  $-C(O)-$ Rest ein  $-(C_6-C_{14})$ -Aryl oder einen  $-(C_5-C_{14})$ -Heterocyclus, wobei die oben unter 1. bis 7. genannten Reste unsubstituiert sind oder ein- bis dreifach substituiert sind unabhängig voneinander durch
    - a)  $-OH$ ,
    - b) Halogen, wie Fluor, Chlor, Brom oder Jod,
    - c)  $-NO_2$ ,
    - d)  $-C(O)-O-(C_1-C_{20})$ -Alkyl, worin Alkyl gerade oder verzweigt ist und unsubstituiert oder ein- bis dreifach substituiert ist durch Halogen, Hydroxyl, Amino oder Nitro, oder
    - e)  $-(C_5-C_{14})$ -Heterocyclus, der unsubstituiert oder ein- bis dreifach substituiert ist durch Halogen, Hydroxyl, Amino oder Nitro,
dadurch gekennzeichnet, dass man
  - a) die Verbindung der Formel I, Alkohol-Dehydrogenase, Wasser, Cofaktor und ein organisches Lösungsmittel mit einem  $\log P$  von 0,5 bis 4,0,
  - b) in einem Zwei-Phasen-System inkubiert und
  - c) die gebildete chirale Hydroxyverbindung isoliert.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verbindung der Formel I aus der Reihe 4-Chlor-3-oxo-butansäurethylester, Acetophenon, Acetessigsäuremethylester, Ethyl-2-oxo-4-phenylbutyrat, 2,5-Hexandion, Ethylpyruvat oder 2-Octanon eingesetzt wird.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein organisches Lösungsmittel mit einem

logP von 0,6 bis 3,0, insbesondere von 0,6 bis 1,9, eingesetzt wird.

4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass ein organisches Lösungsmittel mit einem logP von 0,63 bis 1,75 eingesetzt wird.

5. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als organisches Lösungsmittel Diethylether, tertiär-Butylmethylether, Diisopropylether oder Essigsäureethylester eingesetzt wird.

6. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass eine Alkohol-Dehydrogenasen aus Hefe, Pferdeleber, Thermoanaerobium brockii, Rhodococcus erythropolis, Lactobacillus kefir, Lactobacillus brevis, Lactobacillus minor oder eine Alkohol-Dehydrogenase mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 4 eingesetzt wird.

7. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass ein Puffer wie Kaliumphosphat-, Tris/HCl- oder Triethanolamin-Puffer mit einem pH-Wert von 5 bis 10, bevorzugt mit einem pH-Wert von 6 bis 9, zugesetzt wird.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass dem Puffer Magnesiumionen wie  $MgCl_2$ , in einer Konzentration von 0,2 mM bis 10 mM, bevorzugt 0,5 mM bis 2 mM, zugesetzt werden.

9. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass als Cofaktor NADPH oder NADH in einer Menge von 0,05 mM bis 0,25 mM, insbesondere von 0,06 mM bis 0,2 mM, bezogen auf die wässrige Phase, zugesetzt wird.

10. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Stabilisator für die Alkohol-Dehydrogenase Glycerin, Sorbitol oder Dimethylsulfoxid zugefügt wird.

11. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass Isopropanol zugefügt wird.

12. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindungen der Formel I in einer Menge von 2% bis 30% bezogen auf das Gesamtvolumen, bevorzugt von 10% bis 25%, insbesondere von 15% bis 22%, eingesetzt wird.

13. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung bei einer Temperatur von etwa 10°C bis 70°C, bevorzugt von 30°C bis 60°C, durchgeführt wird.

14. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das organische Lösungsmittel in einer Menge von 1% bis 90% bezogen auf das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes, vorzugsweise von 15% bis 60%, insbesondere von 20% bis 50% eingesetzt werden.

15. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis von organischen Lösungsmittel zu Wasser von 9 zu 1 bis 1 zu 9, vorzugsweise von 1 zu 1 bis 1 zu 3, beträgt.

16. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Stabilisator in einer Menge von 5% bis 30% bezogen auf das Volumen des gesamten Reaktionsansatzes, bevorzugte von 10% bis 20%, insbesondere 20%, eingesetzt wird.

17. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass Isopropanol in einer Menge von 5% bis 30% bezogen auf das Volumen des gesamten Reaktionsansatzes, bevorzugte von 10% bis 20%, insbesondere 10%, eingesetzt wird.

18. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Alkohol-Dehydrogenase in einer Menge von 20 000 U bis 200 000 U pro kg umzusetzender Verbindung der Formel I, bevorzugt etwa 100 000 U, eingesetzt wird.

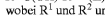
19. Alkohol-Dehydrogenase aus Lactobacillus minor mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 4.

20. DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 3.

21. Mutierte Escherichia coli Zelle hinterlegt unter DSM 14196.

22. Verfahren zur Gewinnung der Alkohol-Dehydrogenase aus Lactobacillus minor gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass man die DNA, die für die Alkohol-Dehydrogenase aus Lactobacillus minor kodiert, in einem geeigneten prokaryotischen oder eukaryotischen Mikroorganismus exprimiert, insbesondere in Zellen von Escherichia coli Zelle hinterlegt unter DSM 14196 exprimiert, und gegebenenfalls die Alkohol-Dehydrogenase reinigt.

23. Verfahren zur Gewinnung einer enantioselektiven (S)-Hydroxyverbindung der Formel II



wobei  $R^1$  und  $R^2$  unabhängig voneinander gleich oder verschieden sind und für

1. Wasserstoffatom,
2.  $-(C_1-C_{20})$ -Alkyl, worin Alkyl geradkettig oder verzweigt ist,
3.  $-(C_2-C_{20})$ -Alkenyl, worin Alkenyl geradkettig oder verzweigt ist und gegebenenfalls ein, zwei, drei oder vier Doppelbindungen enthält,
4.  $-(C_2-C_{20})$ -Alkynyl, worin Alkynyl geradkettig oder verzweigt ist und gegebenenfalls ein, zwei, drei oder vier Dreifachbindungen enthält,
5.  $-(C_6-C_{14})$ -Aryl,
6.  $-(C_1-C_6)$ -Alkyl- $-(C_6-C_{14})$ -Aryl, oder
7.  $R^1$  und  $R^2$  bilden zusammen mit dem  $-C(O)-$ Rest ein  $-(C_6-C_{14})$ -Aryl oder einen  $-(C_6-C_{14})$ -Heterocyclus, wobei die oben unter 1. bis 7. genannten Reste unsubstituiert sind oder ein- bis dreifach substituiert sind unabhängig voneinander durch
  - a)  $-OH$ ,
  - b) Halogen, wie Fluor, Chlor, Brom oder Jod,
  - c)  $-NO_2$ ,
  - d)  $-C(O)-O-(C_1-C_{20})$ -Alkyl, worin Alkyl gerade oder verzweigt ist und unsubstituiert oder ein- bis dreifach substituiert ist durch Halogen, Hydroxyl, Amino oder Nitro, oder
  - e)  $-(C_6-C_{14})$ -Heterocyclus, der unsubstituiert oder ein- bis dreifach substituiert ist durch Halogen, Hydroxyl, Amino oder Nitro,

dadurch gekennzeichnet, dass man

- a) ein racemisches Gemisch, enthaltend die Verbindung der Formel II, die erfindungsgemäße Alkohol-Dehydrogenase, Wasser, Cofaktor und ein organisches Lösungsmittel mit einem logP von 0,5 bis 4,0, beispielsweise aus der Reihe Diethylether, tertiär-Butylmethylether, Diisopropylether oder Essigsäureethylester,
  - b) in einem Zwei-Phasen-System inkubiert und
  - c) die gebildete enantiomerenreine (S)-Hydroxyverbindung isoliert.
24. Verfahren gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass Aceton zugefügt wird.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -